

G R O U P E " M A T I E R E O R G A N I Q U E "
S O U S - G R O U P E " M I C R O B I O L O G I E "

RAPPORT DE SYNTHESE 1979

G. BILLEN¹, J.M. BOUQUEGNEAU², Cl. JOIRIS³, S. VERBEUSTEL¹, J. PUTMAN¹,
J. WIJNANT³, G. PICHOT⁴ et A. HEISE¹

¹ Laboratoire d'Océanographie, U.L.B.

² Laboratoire d'Océanologie, U.Lg.

³ Laboratorium voor Ekologie en Systematiek, V.U.B.

⁴ Unité de Gestion (Ministère de la Santé Publique).

S O M M A I R E

1ère PARTIE : MESURE DES CONCENTRATIONS EN MATIERES ORGANIQUES ET DE

LEUR UTILISATION *in situ*

C . JOIRIS, G. BILLEN et J. WIJNANT

2ème PARTIE : MECANISMES DE L'UTILISATION MICROBIOLOGIQUE DE LA MATIERE

ORGANIQUE

A. STRUCTURE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE EN FONCTION DE SON POIDS MOLECULAIRE

J.M. BOUQUEGNEAU, J. WIJNANT et C. JOIRIS

1° Validation de la méthode d'ultrafiltration

2° Concentrations en matières organiques et activités en fonction
du poids moléculaire.

B. EXOENZYMES ET UTILISABILITE DES MACROMOLECULES : RESULTATS PRELIMINAIRES

J.M. BOUQUEGNEAU, G. BILLEN, J. PUTMAN et C . JOIRIS

1° Mise en évidence d'une activité exoenzymatique dans l'eau de mer

2° Mise au point d'une méthode de mesure de l'activité exoenzymati-
que dans l'eau de mer

3° Utilisabilité des macromolécules dans l'eau de mer naturelle

C. RELATIONS ENTRE LES POPULATIONS DE MICROORGANISMES ET LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT UTILISE

G. BILLEN, S. VERBEUSTEL et G. PICHOT

D. PART RELATIVE DES METABOLISMES FERMENTATIFS ET RESPIRATOIRES DANS LA DEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE

G. BILLEN, J. PUTMAN et A. HEISE

L'objectif des recherches en Microbiologie menées au sein du "Groupe Matière Organique" est de préciser les mécanismes intimes de l'utilisation de la matière organique par les microorganismes aquatiques, en vue d'en comprendre le déterminisme.

La matière organique présente dans l'eau de mer est constituée d'entités chimiques extrêmement hétérogènes ; de même, l'activité hétérotrophe globale recouvre une succession de processus complexes. Il est donc nécessaire, si l'on veut aller au-delà des approches empiriques développées jusqu'à présent, de préciser la spéciation de la matière organique dissoute et de détailler les diverses activités microbiologiques responsables de son utilisation.

Les travaux antérieurs du groupe avaient permis de développer dans ce sens des techniques nouvelles de mesure *in situ* des stocks de matière organique et des activités microbiennes. Les résultats de ces mesures, réalisées lors des campagnes de 1979 sont présentés et discutés dans la 1ère partie de ce rapport.

Cependant, un travail expérimental plus fin a été réalisé en outre pour préciser davantage encore la nature de la matière organique présente dans l'eau de mer et les étapes des processus impliqués dans son utilisation. Ce travail fait l'objet de la seconde partie de ce rapport.

La spéciation de la matière organique peut se faire selon différents critères.

Le critère d'utilisabilité biologique est sans doute le plus utile. La traditionnelle distinction entre BOD et TOC montre qu'une faible partie seulement de la matière organique dissoute est utilisable par les microorganismes. Dans cette fraction cependant, il faut encore distinguer entre la matière *directement utilisable* et celle qui est seulement *potentiellement utilisable*.

On sait en effet que les polymères biologiques (polysaccharides, protéines...) doivent d'abord être hydrolysés avant de pouvoir pénétrer à l'intérieur des cellules bactériennes. Par quels mécanismes se fait cette hydrolyse : cette question est abordée ci-après dans la section qui traite du rôle des *exoenzymes*. Par contre, sont directement utilisables les *petits substrats*, monosaccharides, acides aminés libres, ou leurs petits oligomères, petits acides gras, etc. Ces molécules peuvent éventuellement être dosées individuellement. Bien qu'il soit impossible d'en dresser la liste exhaustive, nous sommes convenu d'appeler "matière organique directement utilisable", la somme de ces petits substrats.

Les techniques d'ultrafiltration, permettant de séparer la matière organique selon sa taille moléculaire, apporte un nouveau critère de spéciation qu'il convient de confronter avec les précédents. S'il est implicite que l'entièreté de ce que nous avons appelé la matière organique directement utilisable soit contenue dans la matière organique de faible poids moléculaire, rien ne peut être prévu *a priori* en ce qui concerne la taille moléculaire de la matière organique non utilisable.

En ce qui concerne les caractéristiques de l'utilisation des petits substrats par les microorganismes, deux questions retiendront notre attention :

Comment la concentration d'un substrat dépend des caractéristiques physiologiques de l'utilisation de ce substrat par les populations de microorganismes ?

Quel est le rôle relatif des organismes à métabolisme respiratoire et fermentatif dans la dégradation de la matière organique et comment ces deux types d'organismes coopèrent dans les milieux naturels ?

1ère PARTIE : MESURE DES CONCENTRATIONS EN MATIERES ORGANIQUES ET DE LEUR

UTILISATION *in situ*

C. JOIRIS, G. BILLEN et J. WIJNANT

1. Concentrations (tableau 1).

D'une manière générale, la première conclusion qui s'impose est que les résultats obtenus en 1979 sont cohérents avec les résultats antérieurs (obtenus en 1977-78).

Quelques exceptions importantes doivent cependant être signalées :

- a) les concentrations de glucose ont été trouvées 4 à 5 fois plus élevées en 1979. D'autre part, ces nouvelles valeurs s'intègrent fort bien dans la série de sucres mesurés en 1979 (les oligosaccharides), puisque le glucose y représente environ 40% du total, en accord avec les données de la littérature.
- b) les concentrations de certains produits de fermentation ne correspondent pas toujours aux valeurs antérieures : le lactate est toujours plus concentré en 1979 (4 à 10 fois) ; pour l'acétate, la valeur de 1979 n'est plus élevée qu'à la station d'Ostende (voir plus loin).

2. Vitesses relatives de consommation (vitesses de turnover) (tableau 2).

La même remarque est d'application : alors que la plupart des résultats obtenus sont très proches des valeurs antérieures, quelques exceptions attirent l'attention, pour le glucose, l'acétate, le lactate et l'aspartate à Calais, et de manière moins dramatique, pour la lysine et le glycollate à Hansweert.

3. Il en résulte des évaluations différentes des activités hétérotrophes exprimées en valeur absolue (tableau 3) : lorsque les résultats sont cohérents, une seule valeur moyenne a été considérée comme représentative de toute la période 1977-1979. Dans les autres cas, deux valeurs ont été reprises, respectivement pour 1977-78 et 1979.

4. Variations temporelles rapides.

La discussion qui précède ne s'appuie que sur les valeurs moyennes obtenues. Pour divers petits substrats, cependant, d'importantes variations peuvent être observées, parfois même d'un jour à l'autre. C'est ainsi que les déterminations de la concentration en glucose pendant la croisière du Fr. HEINCKE (avril 1978) varient fortement (tableau 4).

De telles fluctuations rendent dangereuse l'utilisation de valeurs moyennes qui ne s'appuient que sur un nombre faible de déterminations, et pourraient expliquer les différences notées plus haut.

D'autre part, il est intéressant de noter que d'importantes fluctuations des concentrations sont effectivement prédites par un modèle mathématique (cfr 2ème PARTIE, A.).

Tableau 1. Concentrations en matières organiques *in situ* : synthèse.

		<u>Calais</u>	<u>Oostende</u>	<u>Hansweert</u>
T.O.C. g C/m ³	77-78	7.4 (4)	7.9 (15)	-
	79	5.65 (3)	5.85 (4)	14.5 (3)
BOD ₅ g C/m ³	77-78	0.41 (17)	0.99 (25)	1.83 (2)
	79	0.57 (4)	0.88 (5)	1.14 (5)
BOD ₁₀ g C/m ³	79	0.87 (4)	1.40 (5)	1.64 (5)
Σ carbohydrates	77-78	2.53 (3)	3.19 (3)	3.47 (4)
g C/m ³	79	1.51 (4)	1.73 (4)	5.19 (5)
Glucose mg C/m ³	77-78	4 (11)	8 (14)	13 (4)
	79	25.3 (4)	35 (4)	70.2 (3)
Fructose mg C/m ³	79	24.7 (4)	24 (4)	64.8 (3)
Lactose mg C/m ³	79	14 (4)	16.8 (4)	25.6 (3)
Galactose mg C/m ³	79	3.4 (4)	3.8 (4)	9.7 (3)
Σ oligosaccharides	79	67.4	79.6	170.3
Acétate mg C/m ³	77-78	26.4 (4)	24 (4)	26.4 (5)
	79	24 (4)	4.8 (5)	52.8 (5)
Lactate mg C/m ³	77-78	39.6 (2)	61.2 (4)	7.2 (2)
	79	187 (4)	173 (5)	108 (5)
Glycollate mg C/m ³	77-78	44 (3)	63 (3)	88 (3)
	79	62.1 (4)	52.6 (5)	57.8 (4)

(JOIRIS, BILLEN, WIJNANT, SWAELENS)

Tableau 2. Vitesse relative d'utilisation totale des substrats (I + R),
% h⁻¹.

		<u>Calais</u>	<u>Oostende</u>	<u>Hansweert</u>
Ala	77-78	0.43 (8)	1.20 (6)	4.6 (4)
	79	0.44 (3)	1.04 (4)	4.3 (4)
Asp	77-78	0.10 (6)	1.90 (6)	2.70 (4)
	79	0.81 (3)	1.93 (2)	2.66 (4)
Lys	77-78	1.20 (7)	2.2 (6)	3.60 (4)
	79	1.56 (4)	1.3 (2)	9.43 (4)
Glycol	77-78	0.06 (8)	0.27 (7)	1.7 (6)
	79	0.07 (1)	0.71 (3)	5.0 (4)
Glucose	77-78	0.22 (7)	2.8 (6)	4.4 (5)
	79	2.64 (4)	3.2 (3)	3.36 (3)
Lactose	79	0.13 (3)	0.18 (2)	1.75 (5)
Acétate	77-78	0.06 (7)	1.0 (8)	12.3 (6)
	79	0.51 (3)	0.55 (4)	10.6 (5)
Lactate	77-78	0.04 (9)	0.87 (9)	1.90 (5)
	79	0.22 (3)	0.79 (4)	8.15 (4)
Ethanol	79	0.06 (3)	0.29 (5)	6.6 (4)

(BILLEN, JOIRIS, VANTHOMME, SWAELENS)

Tableau 3. Vitesses absolues d'utilisation ($\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$)

	Conc.	% h ⁻¹	mg C/m ³ .h	
			77-78	79
<u>CALAIS</u>				
Acides aminés	41	0.84	0.340	0.340
Monosaccharides 77-78	13	0.22	0.286	
79	67.4	1.36		0.915
Produits ferm. (1) 77-78	90	0.05	0.045	
79		0.26		0.234
Glycollate	53	0.065	0.034	0.034
TOTAL			0.705	1.523
Respiration totale (V _i O ₂)			9.2 (5)	12.5 (4)
<u>OOSTENDE</u>				
Acides aminés	20	1.6	0.32	0.32
Monosaccharides 77-78	26	2.06	0.52	
79	79.6	2.06		1.58
Produits ferm.	136	0.70	0.95	0.95
Glycollate	57.8	0.49	0.28	0.28
TOTAL			2.07	3.13
Respiration totale			6.70 (3)	18.7 (4)
<u>HANSWEERT</u>				
Acides aminés	18	4.55	0.82	0.82
Monosaccharides 77-78	43	3.17	1.36	
79	170.3	3.17		5.39
Produits ferm.	60	8	4.8	4.8
Glycollate	72.9	3.3	2.4	2.4
TOTAL			9.4	13.4
Respiration totale			11.3 (2)	8.0 (4)

(1) Lactate + Acétate + Ethanol

Tableau 4. Fluctuations de concentration au cours du temps : glucose, carbohydrates totaux (Fr. HEINCKE).

OOSTENDE	Date : 04-78										
	01	02	06	08	09 (0h)	(12h)	12	13	15	16	19
Glucose ³ (mg C/m ³)	-	14.5	3.03	4.42	27.4	4.42	4.60	3.03	1.0	4.59	4.0
Carbohydrates (g C/m ³)	3.5	1.96	5.12	4.2	3.73	2.32	3.2	6.52	2.56	5.36	5.36

CALAIS	Date : 04-78									
	03	04	07	08	12	14	17	18 (12h)	(22h)	
Glucose	27.55	1.90	1.29	10.03	3.24	1.0	1.69	1.0	0.7	
Carbohydrates	4.66	1.83	2.32	2.80	2.08	1.4	0.9	3.3	1.0	

(WILJNANT, JOIRIS)

2ème PARTIE : MECANISMES DE L'UTILISATION MICROBIOLOGIQUE DE LA MATIERE

ORGANIQUE

A. STRUCTURE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE EN FONCTION DE SON POIDS MOLECULAIRE

J.M. BOUQUEGNEAU, J. WIJNANT et C. JOIRIS

La composition de la matière organique dissoute en mer apparaît extrêmement diversifiée et, à l'heure actuelle, on n'est capable d'en caractériser chimiquement qu'un tiers. Il convient donc, dans le cadre d'une étude de la dynamique de la matière organique, d'utiliser des critères plus larges de discrimination. Un de ces critères est la spéciation de la matière organique dissoute en fonction de son poids moléculaire. Cette approche paraît particulièrement pertinente si l'on considère l'hypothèse de BILLEN et al, selon laquelle le recyclage de la DOM à l'intervention des bactéries se fait essentiellement à partir du pool des molécules de faible poids moléculaire. Ce pool serait réalimenté à partir des molécules de haut poids moléculaire suite à l'intervention d'exoenzymes présents dans l'eau et/ou de bactéries (voir B : Exoenzymes et utilisabilité des macromolécules : résultats préliminaires).

En vue de sa séparation en classes de poids moléculaires déterminés, les échantillons, après filtration sur millipore 0.22 μ , ont été ultrafiltrés dans des cellules Amicon pourvues de membranes de porosités de 10000, 1000 et 500 daltons. Dans un premier temps, des tests ont été effectués en vue de valider cette méthode.

Ensuite, à partir d'échantillons prélevés en mer et ultrafiltrés, des mesures de la T.O.C. et des concentrations en carbohydrates totaux ont été réalisées. De même, au laboratoire, des mesures de vitesse initiales de consommation d'O₂ et des BOD₅ ont été effectuées sur les échantillons après ajout d'une population bactérienne standard.

1° Validation de la méthode d'ultrafiltration

Des tests ont été effectués en vue d'estimer

- les pertes ou les contaminations des échantillons au cours des manipulations
- la sélectivité des membranes d'ultrafiltration
- l'efficacité des ultrafiltrations *in situ*.

La plupart des essais ont été effectués à partir d'ovalbumine dissoute dans l'eau de mer : cette protéine, d'un poids moléculaire de 40000, est très soluble et présente une absorption importante à 250 nm suite à la présence d'acides aminés aromatiques.

a. Pertes et contaminations

Les membranes d'ultrafiltration contiennent du glycérol en quantité importante. Lorsque les consignes du fabricant sont respectées, ce glycérol est totalement éliminé. Il n'y a alors pas de contamination des échantillons.

Par contre, au niveau de la filtration sur millipore 0.22 μ , nous avons constaté dans certains cas une adsorption importante de la matière organique dissoute. Ainsi, si on dissout 0.3 mg d'ovalbumine par ml d'eau de mer, et que l'on filtre 20 ml de cette eau successivement sur des filtres millipore 0.22 μ de 4.3 cm de diamètre, on observe le phénomène suivant :

Concentration en protéines du filtrat

Solution de départ	0.3 mg/ml
Après une filtration	0.28 mg/ml
Après 2 filtrations	0.19 mg/ml
Après 3 filtrations	0.07 mg/ml
Après 4 filtrations	non détectable

A la longue, il se produit donc une adsorption totale de la protéine sur les filtres. Dans ce cas, chacune des filtrations était effectuée sur un nouveau millipore. Si cependant, on observe la teneur en protéines du filtrat au cours de l'opération, on peut faire les observations suivantes (figure 1) : au niveau des trois premiers millilitres de filtration, 60% des protéines sont adsorbées sur le filtre.

Un équilibre est cependant rapidement atteint, et, après 9 ml de filtration, l'entièreté des protéines ajoutées se retrouve dans le filtrat. Ce type d'essai a été effectué pour diverses concentrations en ovalbumine. Les résultats obtenus sont semblables.

Il conviendrait donc, lors de la prise d'échantillons destinés à l'étude de la DOM, d'écarter les 10 premiers millilitres de la filtration pour chaque filtre millipore utilisé.

b. Sélectivité des membranes utilisées

Des essais d'ultrafiltration ont été réalisés après ajout de cellulose, de glucose, d'albumine (PM = \pm 40000) et d'un peptide (purifié de PM = 2036).

Le tableau suivant montre que la cellulose ne passe pas le filtre UMO5 (PM = 500 daltons). En effet, la valeur en carbohydate dosée dans le filtrat après addition de cellulose est inférieure aux valeurs témoins.

	<u>Concentrat</u>	<u>Filtrat (UM05)</u>
Témoin (E.M.)	9.4 mg/l	10.9 mg/l
E.M. + cellulose	13.3 mg/l	8.5 mg/l

Par contre, le glucose se retrouve en concentrations égales quelle que soit l'ultrafiltration effectuée (les résultats sont donnés en norme d'absorbance : $\bar{m} \pm$ écart à la moyenne).

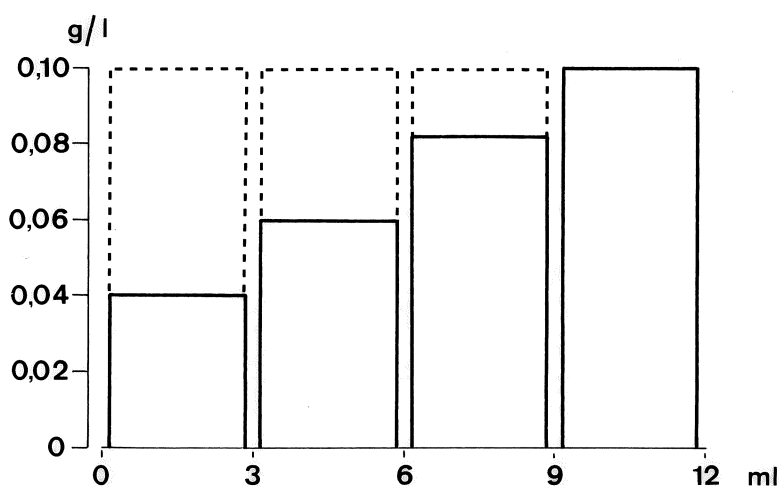


Fig.1. : Concentration en ovalbumine d'une solution d'eau de mer contenant 0.1 g/l après passage sur un filtre millipore 0.22 μ de 43 mm de diamètre.

Concentration de départ : EM :	0.152 \pm 0.012
EM filtrée sur 0.22 μ :	0.101 \pm 0.017
Filtre UM10 (PM = 10000) : filtrat :	0.107 \pm 0.012
Filtre UM2 (PM = 1000) : filtrat :	0.091 \pm 0.005
Filtre UM05 (PM = 500) : filtrat :	0.095 \pm 0.016

En ce qui concerne l'ovalbumine (PM = 40000), aucune trace n'a pu être détectée au niveau des filtrats, et ce, quelle que soit la membrane utilisée (PM = 20000, 10000, 1000, 500). La figure 2 illustre cette observation. De même, des essais ont été effectués à partir d'un peptide purifié d'un poids moléculaire égal à 2036 daltons. Aucun passage du peptide n'est perceptible lors d'une filtration sur UM05 (PM = 500 daltons), comme le montre le tableau suivant :

	<u>Volume</u>	<u>Concentration en protéine</u>
Avant filtration	4 ml	0.5 mg/ml
Concentrat	± 2 ml	0.94 mg/ml
Filtrat	± 2 ml	non dosable
Concentrat	± 1 ml	1.72 mg/ml
Filtrat	± 3 ml	non dosable

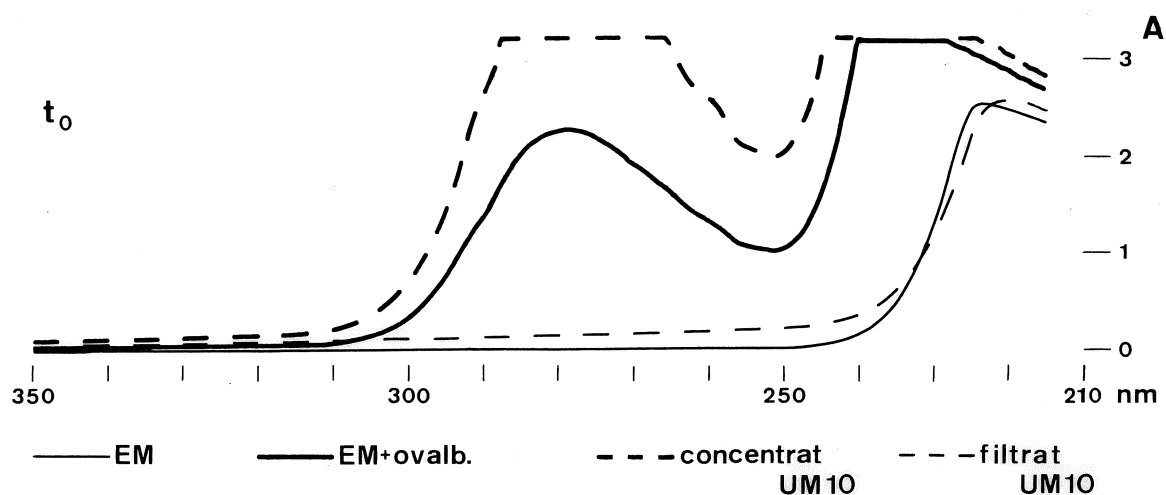


Fig.2. : Spectres U.V. d'une solution d'eau de mer contenant de l'ovalbumine avant et après ultrafiltration sur membrane Amicon UM10 (PM = 10000). Environ la moitié du volume a été ultrafiltré.

c. Efficacité des ultrafiltrations

Les essais de sélectivité décrits dans les paragraphes précédents portent sur des ajouts de matières organiques à des concentrations fort élevées. Cependant, il est possible de montrer qu'il y a, au niveau des échantillons d'eau de mer naturelle, un fractionnement effectif des matières organiques selon leur poids moléculaire.

Les spectres d'absorption U.V. de l'eau de mer par rapport à l'eau distillée montrent une absorption importante à partir de 240-230 nm et dans les longueurs d'ondes inférieures (cfr fig.2). Ce pic d'absorption est essentiellement lié à la présence des ions inorganiques et principalement du NaCl qui présente un maximum d'absorption à 200 nm. Cependant, la présence de molécules organiques provoque un élargissement de ce pic.

A partir de ces considérations, nous avons observé successivement les spectres d'absorption U.V. du concentrat et du filtrat obtenus à partir

de l'ultrafiltration après passage sur millipore 0.22 μ d'eau de mer naturelle sur une membrane UM05 (PM = 500 daltons) et ce, contre de l'eau de mer filtrée sur 0.22 μ . Les résultats sont consignés dans la figure 3. Ils montrent nettement une augmentation de la quantité de matières organiques dans le concentrat et une diminution dans le filtrat.

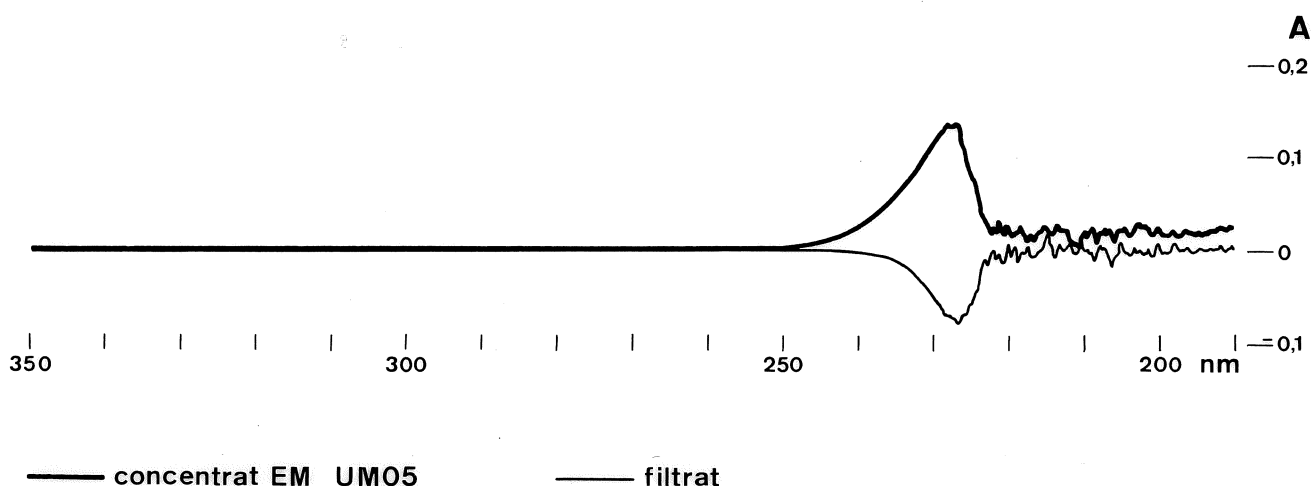


Fig.3. : Spectres U.V. du concentrat et du filtrat d'eau de mer naturelle après passage sur millipore 0.22 μ et ultrafiltration sur membrane Amicon UM05 (500 daltons). Les spectres sont réalisés contre la même eau de mer filtrée sur 0.22 μ .

2° Concentrations en matières organiques et activités en fonction du poids moléculaire

L'ensemble des résultats (T.O.C., concentrations en carbohydrates, demande biologique en oxygène après 5 jours et vitesses initiales d'utilisation des différents substrats) est consigné dans le tableau 1.

Les mesures en carbone total (T.O.C.) étant peu reproductibles, elles fournissent tout au plus un ordre de grandeur de la quantité totale de carbone dissous. Il n'apparaît pas clairement (sauf peut-être dans le cas de la station HANSWEERT) de diminution significative de la concentration en carbone dissous lorsqu'on sélectionne les molécules de faible poids moléculaire. L'examen de ces résultats, sous réserve de confirmation ultérieure et d'une augmentation de la sensibilité de la technique de dosage, suggère qu'une part importante de la matière organique dissoute serait sous forme de molécules de faible poids moléculaire, en tous cas en milieux océanique et côtier. Ces résultats seraient en contradiction avec quelques observations tirées de la littérature (par exemple OGURA, 1974) mais font penser aux travaux de BROWN (1975) au niveau de l'eau de la mer Baltique, qui montrent que les substances humiques de hauts poids moléculaires (>100000 et estimées par leur absorption à 280 nm) ne rendent compte que de 1% de la matière humique totale.

UNITES mg C/l	CALAIS			OSTENDE				HANSWEERT	
	T.O.C. n = 1	Carbohy- drates totaux n = 3	BOD ₅ n = 3	T.O.C. n = 2	Carbohy- drates totaux n = 3	BOD ₅ n = 3	Vi [‡] n = 2	T.O.C. n = 2	Carbohy- drates totaux n = 4
E.M.	5.6	1.7	0.6	14.9	1.9	0.8 (n=2)	-	21.9	5.2
0.22 µ	-	1.7	0.3	-	2.0	0.6	0.024	-	5.1
10000 d	3.9	1.0	0.3	10.5	1.2	-	-	7.5	4.7
1000 d	17.2	1.1	-	11.5	0.8	-	-	-	4.0 (n=3)
500 d	10.6	0.5	0.5	12.3	1.0	0.5	0.026	-	2.3 (n=1)

Tableau 1 : Moyennes des mesures effectuées à partir d'échantillons prélevés en mer durant les campagnes "Matières Organiques" 1979 et ultrafiltrés.

‡ : les BOD₅ et les Vi ont été mesurées sur l'échantillon brut dans le cas de l'eau de mer (EM).
Dans les autres cas, elles ont été mesurées après ajout aux échantillons d'une population bactérienne standard.

+ : en mg C/litre et heure.

totale. Le même auteur a montré en outre que la fraction de haut poids moléculaire était d'autant plus faible que la salinité du milieu était importante.

Si l'essentiel de la matière organique dissoute était constitué par des substances humiques, ces observations seraient cohérentes avec les mesures de T.O.C. réalisées au niveau des trois stations : il y aurait une part importante de la matière organique sous forme de composés de hauts poids moléculaires en milieu estuarien, part qui diminuerait vers le large. Ces hypothèses demandent évidemment à être vérifiées très soigneusement.

Les mesures de concentrations en carbohydrates totaux sont de loin plus fiables et plus reproductibles. De nouveau, la part de carbohydrates de faibles poids moléculaires (> 500 d) paraît fort importante et de l'ordre de 50% des carbohydrates totaux.

Si on compare les résultats obtenus aux mesures de glucose, fructose, lactose et galactose (voir 1ère PARTIE), l'ensemble de ceux-ci ne rendraient compte que de 10% des sucres de poids moléculaires inférieurs à 500 daltons, ce qui indique que d'autres molécules de faibles poids moléculaires dosées comme carbohydrates se trouvent en concentration importante dans l'eau.

Lorsqu'on considère l'utilisation des substrats en fonction de leurs poids moléculaires, on ne constate pas de variation importante entre les échantillons globaux ($< 0.22 \mu$) et ceux où seules les petites molécules ont été conservées (< 500 d), aussi bien en ce qui concerne les V_i que les BOD_5 .

Si on considère les valeurs de BOD_5 à partir d'échantillons de $PM < 500$ d, on constate qu'elles sont très nettement inférieures aux concentrations en carbone organique total dans la même classe de PM.

L'ensemble de ces observations suggère que :

- 1° La vitesse initiale de consommation de la matière organique dissoute ne dépend que de la concentration en substrats de faible poids moléculaire.
- 2° La dégradation de la matière organique de haut poids moléculaire en petits substrats directement utilisables est relativement lente, l'utilisation des classes de haut poids moléculaire n'étant pas dosable de manière significative au cours d'observations limitées à 5 jours.
- 3° Une part importante des substances organiques de faible poids moléculaire n'est pas directement utilisable par les bactéries hétérotrophes aux concentrations où elles se trouvent dans les milieux étudiés.

+ + +

REFERENCES

- BROWN, M. (1975). Marine Chemistry, 3, 253-258.
 OGURA, N. (1974). Marine Biology, 24, 305-312.

B. EXOENZYMES ET UTILISABILITE DES MACROMOLECULES : RESULTATS PRELIMINAIRES

J.M. BOUQUEGNEAU, G. BILLEN, J. PUTMAN et C. JOIRIS

1° Mise en évidence d'une activité exoenzymatique dans l'eau de mer

Si on excepte les phénomènes de pinocytose, la matière organique de haut poids moléculaire, dissoute ou floculée, n'est accessible aux micro-organismes qu'après dégradation en substrats de faible poids moléculaire. Quel est le mécanisme responsable de cette dégradation ?

A priori, au moins, deux phénomènes peuvent intervenir :

- la matière organique, adsorbée sur les parois, pourrait être hydrolysée à ce niveau et utilisée ;
- il peut se produire une sécrétion d'exoenzymes dissous dans l'eau qui dégraderaient la matière organique.

Quelle est la part des deux phénomènes *in situ* ? Pour tenter de répondre à cette question, une série d'expériences a été réalisée à partir d'eau de mer naturelle à laquelle a été ajoutée des substrats organiques de hauts poids moléculaires marqués au ^{14}C .

A l'intérieur d'un boudin à dialyse (qui n'est perméable qu'aux petites molécules de l'ordre de 5000 daltons et moins), se trouve de l'eau de mer naturelle provenant du bassin de chasse d'Ostende. Ce boudin est trempé dans une solution d'eau de mer contenant des substances organiques marquées de haut poids moléculaire (> 10000). Cette solution est

- 1° soit de l'eau de mer naturelle (contenant à la fois bactéries et exoenzymes)
- 2° soit de l'eau de mer naturelle filtrée sur millipore 0.22 μ (contenant exoenzymes mais non bactéries)
- 3° soit une solution de NaCl à 30%.

Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau de la page 16. L'examen des résultats obtenus en milieu extérieur synthétique et lorsque le milieu extérieur est de l'eau de mer filtrée sur millipore 0.22 μ montre l'existence d'une activité exoenzymatique de l'eau de mer. Cependant, la radioactivité importante observée lorsque le milieu extérieur est synthétique suggère une dégradation spontanée non négligeable des substrats marqués ou une purification insuffisante des substances marquées de haut poids moléculaire.

Le fait que les expériences réalisées avec de l'eau de mer non filtrée dans le milieu extérieur montrent la présence d'un passage beaucoup plus faible de radioactivité s'explique par l'existence dans ce cas d'une absorption par les bactéries des substrats libérés par hydrolyse.

MILIEU EXTERIEUR	Radioactivité (coups/min) à l'intérieur du boudin après			
	1h	2h	4h	24h
<u>Expérience 1</u>				
EM brute + Protéines* (1)	4	-	20	466
EM 0.22 μ + Protéines	64	-	153	1409
Solution de NaCl + Protéines	-	-	66	-
<u>Expérience 2</u>				
EM brute + Polysaccharides* (1)	52	-	121	1235
EM 0.22 μ + Polysaccharides	112	-	376	4731
Solution de NaCl 30‰ + Polysaccharides	-	-	297	-

(1) A partir d'un hydrolysate d'une culture de phytoplancton marqué

2° Mise au point d'une méthode de mesure de l'activité exoenzymatique dans l'eau de mer

Ayant montré l'existence d'une activité exoenzymatique libre dans l'eau de mer, il nous a semblé important de mettre au point des techniques de mesure quantitative de cette activité.

L'action des exoenzymes en effet pourrait être le facteur limitant dans les processus d'utilisation de la matière organique par les bactéries.

Des techniques de mesure de l'activité exoenzymatique sont mentionnées dans la littérature. Ces techniques sont basées sur la mesure spectrophotométrique de la production d'un monomère coloré à partir d'un complexe substrat-colorant hydrolysé par l'exoenzyme.

Ces méthodes ont été testées mais elles s'avèrent trop peu sensibles pour être appliquées aux milieux étudiés par le groupe "Matière Organique". Une technique plus fine, semblable à celle développée au 1° est en cours de mise au point : on place dans un tube à essai un échantillon du milieu étudié filtré sur 0.2 μ où l'on a rajouté des substances organiques marquées de haut poids moléculaire (extrait d'une culture de phytoplancton ou de bactéries marquées). On prélève régulièrement une aliquote que l'on ultrafiltre sur membrane de 10000 d. Les substances de haut poids moléculaire sont retenues par une membrane d'une telle porosité, mais pas les monomères résultant de leur hydrolyse enzymatique. On peut donc, par mesure de la radioactivité du filtrat, suivre l'activité exoenzymatique au cours du temps.

Cette méthode, testée sur de l'eau de l'Escaut où l'activité bactérienne est relativement intense, semble ne pas être encore assez sensible et il est nécessaire de concentrer le milieu analysé pour obtenir une mesure plus précise.

3° Utilisabilité des macromolécules dans l'eau de mer naturelle

La méthode la plus directe qui permet de tester la biodégradabilité de divers substrats en eau de mer consiste à les inoculer dans de l'eau de mer fraîche et à suivre, au cours du temps, la consommation d'oxygène qui en résulte (cinétique de type BOD).

Quelques expériences préliminaires ont été réalisées dans ce sens, avec des ajouts de cellulose et d'amidon (voir tableaux pages 18 et 19).

On peut y constater que l'amidon est utilisé à raison de 40 à 50% de l'ajout, et ce très rapidement (1er jour). La cellulose est utilisée avec un taux beaucoup plus faible, mais qui se maintient plus longtemps en cours de cinétique. Aux concentrations les plus faibles - addition de 0.5 et 1 mg cellulose/litre - la consommation est totale et assez rapide (5 à 10 jours). Dans la mesure où ces résultats seront confirmés ultérieurement, l'intervention d'un ou plusieurs mécanismes pourrait être impliquée : une très faible solubilisation de la cellulose et, éventuellement, une action exoenzymatique.

		mg C/l consommé	
		total	- témoin eau de mer
1. eau de mer	1 jour	.07	
(Oostende, 12.2.80)	6 jours	.59	
	10 jours	.75	
	15 jours	.76	
2. idem + 10 mg cellulose/l			
	1 jour	.23	.16
	6 jours	1.11	.52
	10 jours	1.66	.91
	15 jours	2.04	1.28
3. idem + 5 mg cellulose /l			
	1 jour	.19	.11
	6 jours	.95	.36
	10 jours	1.22	.48
	15 jours	1.59	.83
4. idem + 0.5 mg cellulose/l			
	1 jour	.18	.10
	6 jours	.83	.24
	10 jours	1.02	.27
	15 jours	1.09	.33
5. idem + 0.5 mg amidon/l			
	1 jour	.19	.12
	6 jours	.70	.11
	10 jours	.89	.14
	15 jours	.89	.13
6. idem + 0.25 mg amidon/l			
	1 jour	.14	.07
	6 jours	.50	.00
	10 jours	.80	.04
	15 jours	-	-

		mg C/l consommé	
		total	- témoin eau de mer
1. eau de mer (Spuikom, 11.1.80)	1 jour	.17	
	5 jours	.71	
	10 jours	1.08	
	31 jours	2.07	
2. idem + 10 mg amidon/l	1 jour	.20	.03
	5 jours	1.13	.42
	10 jours	1.24	.15
	31 jours	> 3.23	> 1.16
3. idem + 1 mg amidon/l	1 jour	.17	.00
	5 jours	.93	.22
	10 jours	1.30	.22
	31 jours	2.89	.82
4. idem + 1 mg cellulose/l	1 jour	.18	.01
	5 jours	.98	.28
	10 jours	1.65	.57
	31 jours	2.11	.64

C. RELATIONS ENTRE LES POPULATIONS DE MICROORGANISMES ET LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT UTILISE

G. BILLEN, S. VERBEUSTEL et G. PICHOT

1. De nombreux travaux expérimentaux montrent que la cinétique globale d'utilisation d'un substrat (S) donné par les communautés bactériennes mixtes des milieux naturels peut bien souvent être représentée, avec une bonne approximation, par une cinétique Michaëlienne

$$V_{\text{utilisés}} = \sum_i V_{\text{utills}} \approx V_{\text{max}} \frac{S}{S+K_m} \quad (1)$$

La validité théorique de ce type d'analyse a été discutée par WILLIAMS (1973). Certaines exceptions ont été signalées (VACCARO et JANNASCH, 1967 ; HAMILTON et PRESLAN, 1970 ; BARVENIK et al, 1979), mais concernent le plus souvent des milieux extrêmement oligotrophes.

Notre expérience confirme que, dans les milieux les plus variables, ce type de cinétique s'applique effectivement. La figure 1 représente quelques exemples de détermination du K_m d'utilisation de divers substrats dans l'eau de la Mer du Nord, de l'estuaire de l'Escaut et dans les sédiments marins.

2. La validité de la relation (1) implique soit qu'une seule souche bactérienne domine nettement dans la communauté utilisatrice du substrat, soit que toutes les souches dominantes de la communauté aient un K_m très proche. La valeur du K_m caractérise donc l'affinité des populations bactériennes dominantes pour le substrat considéré. Le fait que dans la plupart des cas la cinétique globale d'utilisation des substrats soit michaëlienne résulte précisément, pensons-nous, du fait que la compétition que se livrent les différentes souches de microorganismes pour l'utilisation du substrat aboutit à sélectionner les souches présentant les K_m les plus bas.

On peut s'attendre à ce que cette pression sélective soit d'autant plus forte pour un substrat donné que le milieu est moins "riche" en ce substrat, c'est-à-dire qu'il y est produit en quantités plus faibles.

Nous avons donc cherché à mettre en relation la vitesse totale d'utilisation (et donc de production) de différents substrats dans toute une gamme de milieux naturels et le K_m d'utilisation des communautés de microorganismes de ces milieux.

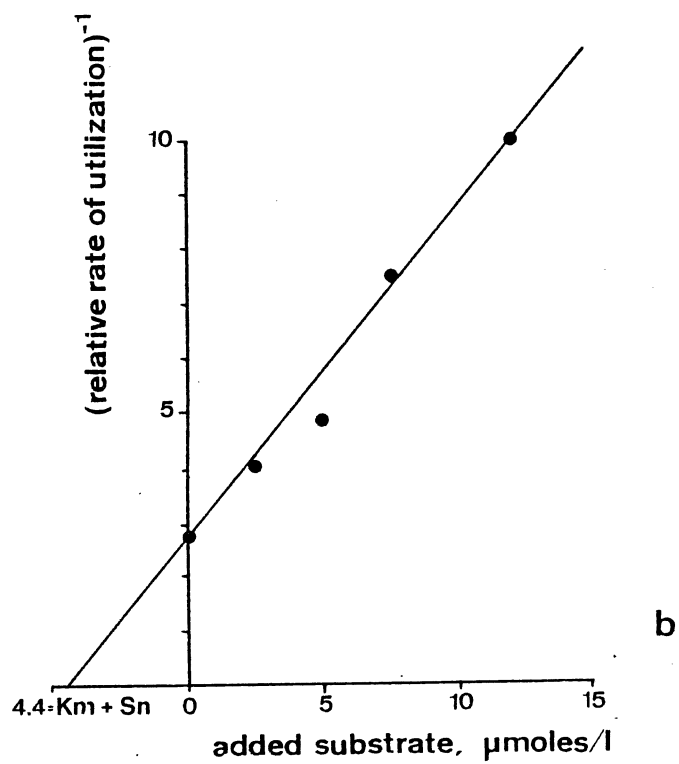
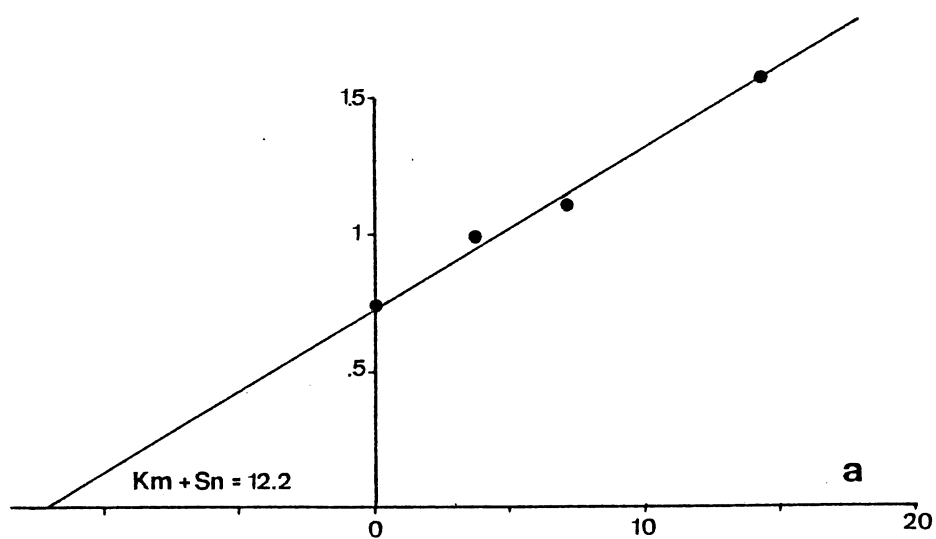
Les données qui nous ont servi pour cette analyse proviennent soit de la littérature, soit de nos propres mesures. Elles concernent essentiellement l'utilisation de l'acétate et du glycollate, substrats pour lesquels nous disposons des informations les plus nombreuses. Ces données sont résumées dans le tableau 1.

La figure 2 montre en effet, à travers toute la gamme des milieux

Figure 1. Représentation inverse de la vitesse relative d'utilisation de substrat après addition de concentrations croissantes de ce substrat.

a. Acétate; Escaut, km 94, septembre 1979.

b. Ethanol; Escaut, km 103, juin 1979.



naturels envisagés, couvrant plus de 7 ordres de grandeur de vitesse totale d'utilisation des substrats, l'existence d'une relation entre cette vitesse et la valeur du K_m . Les milieux les plus "pauvres" sont ceux dans lesquels les K_m des populations sont les plus faibles, deux à trois ordres de grandeur plus faibles que dans les milieux les plus riches.

3. Dans un article précédent (BILLEN et al, 1980), il a été montré que lorsqu'un état stationnaire est établi entre la production d'un substrat particulier et son utilisation par une population microbienne, la concentration du substrat (S) est indépendante du flux de production de ce substrat et obéit approximativement à la relation

$$S = \frac{K_m}{\frac{v'_m}{k_d} - 1} \approx \frac{K_m}{3} \quad (2)$$

(d'où v'_m est la vitesse maximale de croissance des bactéries sur le substrat, et k_d leur taux de mortalité).

A l'état stationnaire, la concentration en substrat ne dépendrait donc pratiquement que de la valeur du K_m des populations microbiennes utilisatrices de ce substrat.

La question est de savoir dans quelle mesure l'état stationnaire est approché dans les milieux naturels soumis à des fluctuations du flux de production des petits substrats. BILLEN et al (1980) s'étaient livrés déjà à certaines simulations permettant d'apprécier l'importance possible des écarts à la stationnarité résultant soit d'une modification brutale du flux de production de substrat, soit de variations périodiques (nycthémérales par exemple) de celui-ci. Ces simulations montraient que dans la plupart des situations, la concentration en substrat et la densité bactérienne pouvaient être considérées avec une bonne approximation comme étant à l'état stationnaire par rapport au flux de production : après une perturbation soudaine, les conditions stationnaires sont restaurées en 2-3 jours ; lorsque des fluctuations périodiques du flux de production interviennent, la concentration en substrat et la densité bactérienne varient peu autour de leur état stationnaire.

PICHOT et OZER (1980) ont cependant montré par simulation qu'un déséquilibre prolongé entre la production de substrats organiques et leur utilisation par les microorganismes hétérotrophes pouvait résulter, au printemps, de la croissance rapide de la production primaire, entraînant une augmentation importante de la concentration en substrats, suivie éventuellement d'oscillations de cette concentration et de la population microbienne. La figure 3 montre quelques simulations allant dans le même sens, où l'on a fait croître le flux de production (P) de substrat selon une cinétique logistique :

$$\frac{dP}{dt} = k_p P \left(1 - \frac{P}{K}\right)$$

TABLEAU 1 : Relation entre la vitesse totale d'utilisation de différents substrats, le Km des populations naturelles de microorganismes pour ces substrats et la concentration moyenne de ces substrats, dans divers milieux naturels.

1) ACETATE

Milieu Naturel	vitesse d'utilisation $\mu\text{moles/l.h}$	Km ($\mu\text{moles/l}$)	concentration ($\mu\text{moles/l}$)	Auteurs
Océan Pacifique (au large du Canada)	8 - $1.3 \cdot 10^{-4}$	0.14 - 0.65	0.14 - 0.65	Parsons & Strickland, 1962
Mer du Nord (Baie Sud)	0.2 - 10^{-3}	0.5 - 1.3	0.2 - 1	Billen (non publié)
Estuaire de l'Escaut (aval)	1 - $5 \cdot 10^{-2}$	1 - 3	0.5' - 2	Billen et al, 1980
Estuaire de l'Escaut (amont)	1 - 12	3.5 - 11	1 - 5	Billen et al, 1980
Lagune d'aération de déchets de pâte à papier	0.39 - 0.52	14 - 24	2.5 - 12	Stanley & Staley, 1977
Sédiments marins côtiers (Mer du Nord)	0.25 - $1 \cdot 10^{-2}$	13 - 50	5 - 30	Verbeustel & Billen. (non publié)
Sédiments lacustres	1.08 - $3.30 \cdot 10^{-2}$	80 - 120	180 - 550	Strayer & Tiedje, 1978
Boues activées de station d'épuration	2 - $3 \cdot 10^{-4}$	200 - 500	200 - 500	Billen et al (non publié)

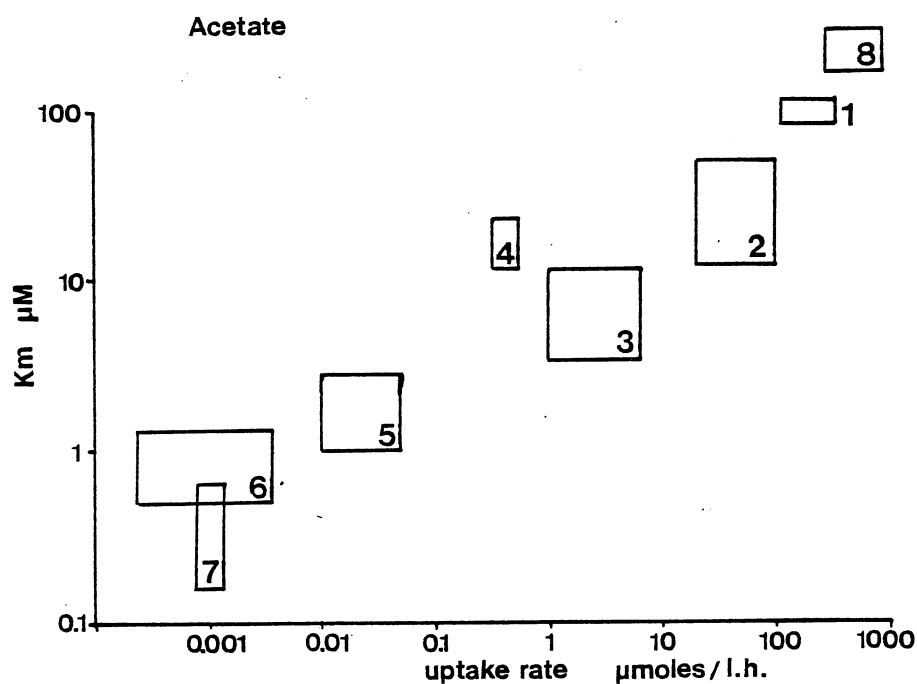
2) GLYCOLLATE

	vitesse d'utilisation $\mu\text{moles/l.h}$	Km ($\mu\text{moles/l}$)	concentration ($\mu\text{moles/l}$)	Auteurs
Ipswich et Booth Bay	1 - 0.05	20 - 150	10 - 80	Wright & Shah, 1975
Lake Biwa	.75 - 0.032	30 - 650	-	Tonaka et al, 1975
Mer du Nord (Baie Sud)	4 - 0.05	-	50 - 300	Billen (non publié)
Estuaire de l'Escaut (aval)	5 - 1	300 - 500	100 - 300	Billen (non publié)

Figure 2. Relation entre le K_m et la vitesse totale d'utilisation de l'acétate dans divers milieux naturels:

1. Sédiments d'un lac hypereutrophe
2. Sédiments marins côtiers
3. Lagune d'aération de déchets de pâte à papier.
4. Estuaire de l'Escaut, zone amont.
5. " " , zone aval.
6. Mer du Nord, baie Sud.
7. Ocean pacifique, au large des côtes canadiennes.
8. Boues activées de station d'épuration.

(voir tableau 1)



De manière à présenter le maximum de généralité, ces simulations ont été effectuées en variables réduites définies de la manière suivante :

$$S^* = \frac{S}{K_m}$$

$$B^* = \frac{B}{Y K_m}$$

$$P^* = \frac{P}{k_d \cdot K_m}$$

$$t^* = t \cdot k_d$$

(où Y est le rendement de croissance des bactéries par mole du substrat utilisé).

Dans ce cas, les seuls paramètres numériques à définir sont :

$$v_m^* = \frac{v'_m}{k_d}$$

(c'est-à-dire le rapport du taux *maximal* de croissance des bactéries à leur taux de mortalité)

$$p^* = \frac{k_p}{k_d}$$

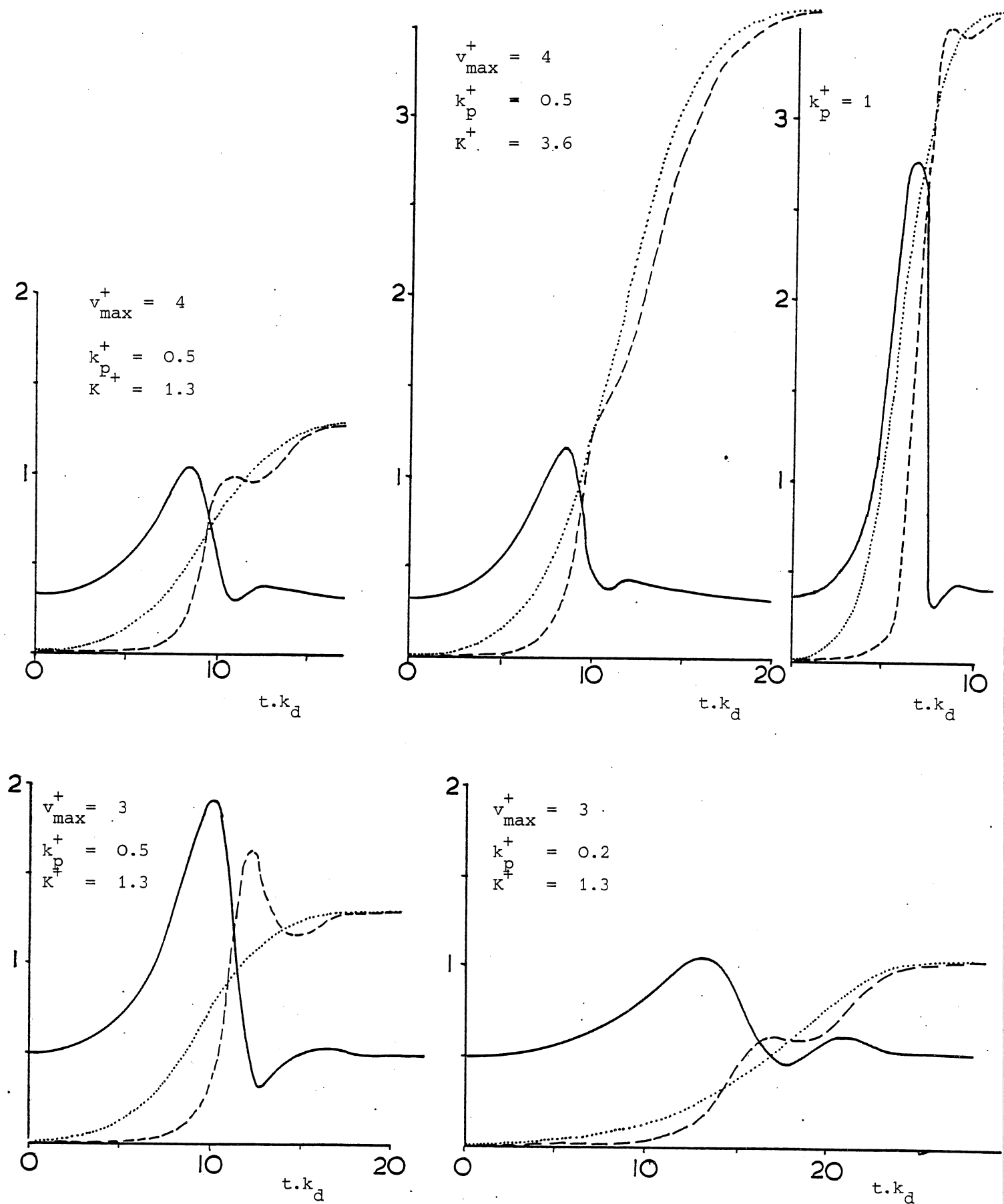
(c'est-à-dire le rapport du taux de croissance du phytoplancton à celui des bactéries)

$$\text{et } K^* = \frac{K}{k_d K_m}$$

La gamme de valeurs numériques à considérer pour ces trois paramètres est relativement réduite. En effet,

- a) l'expérience montre que les potentialités maximum de croissance des bactéries sont le plus souvent loin d'être réalisées dans les milieux naturels, et que toute augmentation expérimentale de la concentration en substrat s'accompagne d'une augmentation de l'uptake de ce substrat (cfr les expériences de détermination des K_m). Le rapport $\frac{v'_m}{k_d}$ est donc rarement très proche de 1, et la gamme 5 - 2 nous paraît raisonnable.
- b) les organismes phytoplanctoniques présentent en général des taux de renouvellement inférieurs à ceux des bactéries. Le rapport $\frac{k_p}{k_d}$ doit être inférieur à 1. La valeur de 0.5 ne nous paraît pas devoir être dépassée.
- c) dans les milieux marins étudiés jusqu'ici, nous n'avons jamais mesuré de valeurs supérieures à 10 % h^{-1} pour la vitesse relative d'utilisation des petits substrats individuels. Si l'on fixe k_d à 0.05 h^{-1} (BILLEN et al, 1978), ceci limite K^* à 0.75 - 2 environ.

Figure 3. Simulations de l'évolution de la concentration en substrat (—), et de la biomasse bactérienne (----) lors d'une augmentation prolongée du flux de production de substrat (.....).



Les résultats de ces simulations montrent que, selon la valeur des paramètres, un accroissement temporaire de la concentration en substrat de l'ordre d'un facteur 3 à 5 peut se produire durant la phase de croissance du flux de production. Ceci explique sans doute la variabilité observée dans les mesures en mer de concentration et d'utilisation des petits substrats, surtout en période de bloom phytoplanctonique.

Cette variabilité reste cependant limitée, dans la plupart des cas à moins d'un ordre de grandeur. Nous avons donc cherché à vérifier la relation approximative (2) en comparant, dans différents milieux, la gamme des valeurs de concentration en substrat avec celle des K_m des populations utilisatrices. Les données qui nous ont servi pour cette analyse figurent dans le tableau 1.

Elles sont résumées dans la figure 4 qui montre que la relation (2) est vérifiée avec une bonne approximation à travers tout l'éventail des milieux naturels considérés, dans lesquels les K_m varient sur trois ordres de grandeur.

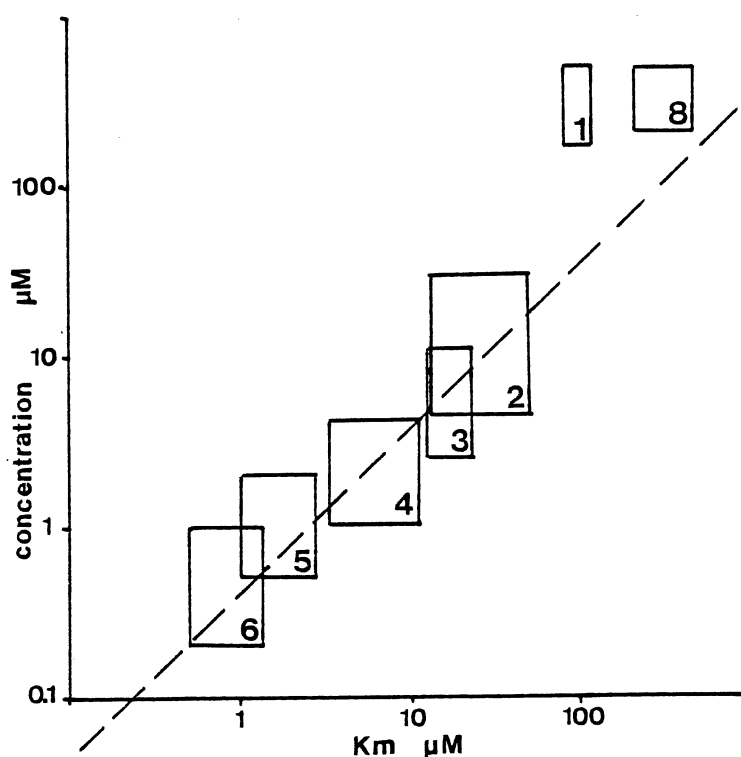


Figure 4 : Relation entre le K_m et la concentration stationnaire de l'acétate dans divers milieux naturels (voir figure 2 et tableau 1).

REFERENCES

- BILLEN, G., PUTMAN, J. et HEISE, A. (1980). Fermentation products in the Scheldt Estuary. Submitted to *Ant. Van Leeuwenhoek*.
- BILLEN, G., JOIRIS, C., WIJNANT, J. et GILLAIN, G. (1980). Concentration and microbiological utilization of small organic molecules in the Scheldt Estuary, the Belgian coastal zone of the North Sea and the English Channel. *Estuarine and Coastal Marine Science*, in press.
- HAMILTON, R.D., MORGAN, K.M. et STRICKLAND, J.D.J. (1966). The glucose uptake of some marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 12, 995-1003.
- PARSONS, T.R. et STRICKLAND, J.D.J. (1962). On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in seawater. *Deep Sea Research*, 8, 211-222.
- PICHOT, G. et OZER, J. (1980). Simulation du rôle des bactéries hétérotrophes dans les processus de biodégradation des matières organiques dissoutes en Mer du Nord. Technical Report OM.
- STANLEY, P.M. and STALEY, J.T. (1977). Acetate uptake by aquatic bacterial communities measured by autoradiography and filterable radioactivity. *Limnology and Oceanography*, 25-37.
- STRAYER, R.F. et TIEDJE, J.M. (1978). Kinetic parameters of the conversion of methane precursors to methane in a hypereutrophic lake sediment. *Appl. Environm. Microbiol.*, 34, 330-340.
- VACCARO, A. et JANNASCH, H.W. (1967). Variation in uptake kinetics for glucose by natural populations in sea water. *Limnology and Oceanography*, 12, 540-542.
- WILLIAMS, P.J. le B. (1973). The validity of application of simple kinetic analysis to heterogeneous microbial populations. *Limnology and Oceanography*, 18, 159-164.
- WRIGHT, R.T. et HOBIE, J.E. (1966). Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology*, 47, 447-453.

D. PART RELATIVE DES METABOLISMES FERMENTATIFS ET RESPIRATOIRES DANS LA
DEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE

G. BILLEN, J. PUTMAN et A. HEISE

Une fois prélevés par les microorganismes, les substrats organiques directement utilisables sont métabolisés : une partie en vue de la production de biomasse (anabolisme), une autre en vue de la production d'énergie (catabolisme).

Le catabolisme des substrats organiques peut être de type respiratoire (oxydation généralement complète aux dépens d'un oxydant extérieur) ou fermentatif (réorganisation sans recours à un oxydant extérieur).

Dans ce dernier cas, un produit de fermentation est libéré, qui pourra servir de substrat à un autre métabolisme respiratoire ou fermentatif, ce qui donne lieu à un réseau métabolique éventuellement très rubriqué.

On sait peu de choses de la structure des réseaux métaboliques dans les milieux aquatiques naturels. En particulier, quel est le rôle des métabolismes fermentatifs dans le processus global de dégradation de la matière organique ? Comment les métabolismes fermentatifs et respiratoires coopèrent-ils pour assurer la dégradation complète du carbone organique ?

Cette question a été abordée en détail dans l'estuaire de l'Escaut, milieu qui convient bien pour une telle étude, parce qu'il présente tout un spectre de conditions rédox, depuis des eaux tout à fait saturées en oxygène dissous en aval, jusqu'à des conditions anaérobies très réductrices en amont. L'approche expérimentale a consisté à mesurer la concentration et la vitesse d'utilisation de trois importants produits de fermentation. Lactate, acétate et éthanol dans l'eau de l'estuaire, *in situ*, ou lors d'incubations en conditions contrôlées.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication (1) ; ils sont résumés brièvement ci-dessous :

1. Même en aérobiose, les voies fermentatives intéressent une part non négligeable du flux de carbone dégradé : de l'ordre de 30% en aérobiose et jusqu'à 100% en anaérobiose.
2. Les produits de fermentations ne s'accumulent normalement pas, sauf de façon temporaire, lors du passage à une situation très réductrice (sulfato-réduction) en ce qui concerne l'acétate et lors du début de la réoxydation en ce qui concerne l'éthanol. En dehors de ces situations temporaires, des populations de bactéries respiratoires s'adaptent au flux de production de produits de fermentation.

(1) Fermentative and respiratory metabolism in the Scheldt Estuary . G. BILLEN, J. PUTMAN et A. HEISE, soumis à Antonie van LEEUWENHOEK.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient R. BIONDO (U.Lg), R. SWAELENS (V.U.B.)
et R. VANTHOMME (V.U.B.) pour leur excellente aide technique.

+ + + +